

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-355031  
 (43)Date of publication of application : 10.12.2002

(51)Int.Cl.

C12N 5/06  
 A61F 2/02  
 A61L 27/00

(21)Application number : 2001-322549

(71)Applicant : SONY INTERNATL EUROP GMBH  
 MAX PLANCK GES ZUR FOERDERUNG DER  
 WISSENSCHAFTEN EV

(22)Date of filing : 19.10.2001

(72)Inventor : NELLES GABRIELE  
 YASUDA AKIO  
 KNOLL WOLFGANG  
 OFFENHAUSSER ANDREAS  
 YEUNG CHI-KONG  
 LAUER LARS

(30)Priority

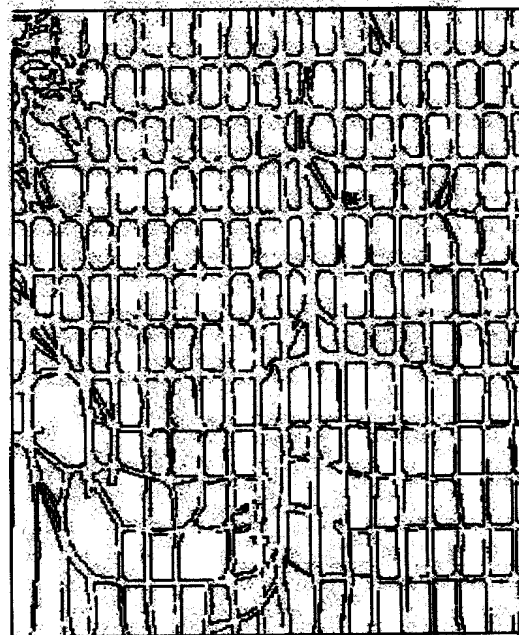
Priority number : 2000 00122915    Priority date : 20.10.2000    Priority country : EP

**(54) METHOD OF FORMING CELL PATTERN**

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To enable the growth of cells on a surface to be accurately controlled and guided.

**SOLUTION:** This method of forming a cell pattern comprises a step for prepatterning by attaching a cell growth-promoting molecule and/or a cell growth-inhibiting molecule on the surface on which the cell pattern may be formed, and a step for forming the cell pattern on the surface by culturing the cells on the surface having the prepattern.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]	16.09.2004
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	abandonment
[Date of final disposal for application]	11.01.2007
[Patent number]	
[Date of registration]	

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-355031

(P2002-355031A)

(43)公開日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

テーマト(参考)

C 1 2 N 5/06

A 6 1 F 2/02

4 B 0 6 5

A 6 1 F 2/02

A 6 1 L 27/00

U 4 C 0 8 1

A 6 1 L 27/00

C 1 2 N 5/00

E 4 C 0 9 7

審査請求 未請求 請求項の数40 O L 外国語出願 (全 38 頁)

(21)出願番号 特願2001-322549(P2001-322549)

(22)出願日 平成13年10月19日(2001.10.19)

(31)優先権主張番号 0 0 1 2 2 9 1 5 . 2

(32)優先日 平成12年10月20日(2000.10.20)

(33)優先権主張国 欧州特許庁 (E P)

(71)出願人 598094506

ソニー インターナショナル (ヨーロッパ)  
ゲゼルシャフト ミット ベシュレ  
ンクテル ハフツング

ドイツ連邦共和国 10785 ベルリン ケ  
ンパーブラッツ 1

(74)代理人 100067736

弁理士 小池 晃 (外2名)

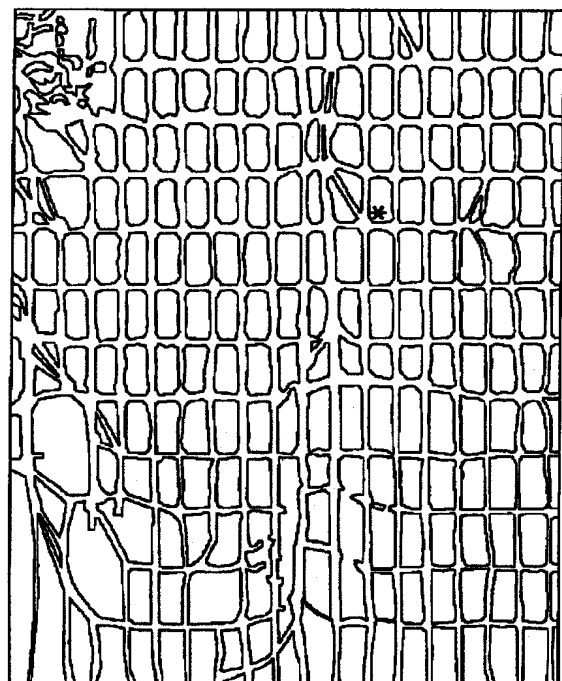
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞パターンの形成方法

(57)【要約】

【課題】 表面上での正確な細胞の成長を制御及び誘導可能とする。

【解決手段】 細胞パターンを形成しようとする表面に細胞成長促進分子及び/又は細胞成長阻害分子を当該表面にパターン被着させることによって予備パターンする工程と、上記予備パターンされた表面上に細胞を培養することによって上記表面上に細胞パターンを形成する工程とを有し、上記細胞が全体組織である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞パターンを形成しようとする表面に、細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子を当該表面にパターン被着させることによって予備パターンする工程と、

上記予備パターンされた表面上に細胞を培養することによって、上記表面上に細胞パターンを形成する工程とを有し、

上記細胞が全体組織であることを特徴とする表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項2】 上記全体組織が、生物の組織体由来のものであることを特徴とする請求項1記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項3】 上記全体組織が、脳、肝臓、腎臓、筋肉、皮膚、骨、肺及び心臓を含む群から選ばれる器官に由来するものであることを特徴とする請求項1又は請求項2のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項4】 上記細胞が、器官の組織切片であることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項5】 上記細胞が、脳の組織切片であることを特徴とする請求項4記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項6】 上記予備パターンされた表面に被着された上記細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子のパターンが、細胞の成長及び移動を誘導することを特徴とする請求項1乃至請求項5のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項7】 上記細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子のパターンが、器官の細胞の配列を模倣したものであることを特徴とする請求項6記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項8】 上記細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子のパターンが、筋及び節を有する構造であることを特徴とする請求項1乃至請求項7のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項9】 上記筋の幅が $1\mu\text{m}$ ～ $8\mu\text{m}$ の範囲であり、上記節の直径が $1\mu\text{m}$ ～ $30\mu\text{m}$ の範囲であることを特徴とする請求項8記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項10】 上記筋の幅が $1\mu\text{m}$ ～ $6\mu\text{m}$ の範囲であり、上記節の直径が $8\mu\text{m}$ ～ $16\mu\text{m}$ の範囲であることを特徴とする請求項9記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項11】 上記筋の幅が $2\mu\text{m}$ ～ $4\mu\text{m}$ の範囲であり、上記節の直径が $10\mu\text{m}$ ～ $14\mu\text{m}$ の範囲であることを特徴とする請求項10記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項12】 上記細胞成長促進分子及び／又は細胞

成長阻害分子のパターンが、ポリペプチド、ポリエチレンイミン及びポリスチレンを含む群から選ばれる物質の少なくとも1層によって形成されることを特徴とする請求項1乃至請求項11のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項13】 上記ポリペプチドが、細胞外基質タンパク質、ポリ-L-リジン及びポリ-オルニチンを含む群から選択されることを特徴とする請求項12記載の表面への細胞パターンの形成方法。

10 【請求項14】 上記細胞外基質タンパク質が、ラミニン及びフィブロネクチンを含む群から選択されることを特徴とする請求項13記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項15】 細胞パターンを形成しようとする表面に、細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子を当該表面にパターン被着させることによって予備パターンする工程と、

上記予備パターンされた表面上に細胞を培養することによって、上記表面上に細胞パターンを形成する工程と、上記表面上に形成された上記細胞パターンを、その後、第2の表面へ転写する転写工程とを有し、

上記細胞が、全体組織及び解離された細胞を含む群から選択されるものであることを特徴とする請求項1乃至請求項14のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項16】 上記転写工程が、

- a) マトリクスに上記細胞パターンを埋め込む手順と、
- b) 上記予備パターンされた表面から、上記細胞パターンを含む上記マトリクスを引き上げる手順と、
- c) 上記マトリクスに埋め込まれた上記細胞パターンを、上記第2の表面に接触させる手順とを含むことを特徴とする請求項15記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項17】 上記転写工程が、さらに

- d) 上記マトリクスから、上記細胞パターンを離型する手順と、
- e) 上記細胞パターンから、上記マトリクスを除去する手順とを含むことを特徴とする請求項15又は請求項16のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項18】 上記マトリクスが、細胞と適合性のあることを特徴とする請求項16及び請求項17のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項19】 上記マトリクスが、アガロース、フィブリン、コラーゲン及びセルロースを含む群から選ばれる材料からなることを特徴とする請求項16乃至請求項18のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項20】 上記マトリクスが、硬化可能な材料からなることを特徴とする請求項16乃至請求項18のい

いずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項21】 上記硬化可能な材料が、アガロースを含む群から選ばれることを特徴とする請求項20に記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項22】 上記マトリクスが、ゲルを形成可能な材料からなることを特徴とする請求項16乃至請求項18のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項23】 上記ゲルを形成可能な材料が、フィブリノゲン及びコラーゲンを含む群から選ばれることを特徴とする請求項22記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項24】 上記第2の表面が、生物電子デバイスの表面、センサ、電子素子、組織、インプラント及び移植組織を含む群から選ばれることを特徴とする請求項15乃至請求項21のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項25】 上記埋め込み工程が、  
a a) 液体状の上記マトリクスで、上記細胞パターンの一部又は全体を被覆する手順と

a b) 上記マトリクスを形成する手順とを有することを特徴とする請求項16乃至請求項24のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項26】 上記マトリクスの形成は、ゲル転移温度以上に温度を上昇させること、及び／又は少なくとも1つのゲル誘導要素の添加により行われることを特徴とする請求項25記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項27】 上記ゲル誘導要素が、トロロビン及び他の血液凝固因子を含む群から選ばれることを特徴とする請求項26記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項28】 上記マトリクスからの上記細胞パターンの離型は、酵素による分解及び／又はゲル転移温度未満に温度を低下させることによって行われることを特徴とする請求項17乃至請求項27のいずれかに記載の表面への細胞パターンの形成方法。

【請求項29】 請求項1乃至請求項14のいずれかに記載される表面への細胞パターンの形成方法によって作成可能である細胞パターン。

【請求項30】 請求項1乃至請求項14のいずれかに記載される表面への細胞パターンの形成方法によって作成可能である表面上の細胞パターン。

【請求項31】 請求項1乃至請求項28のいずれかに記載される表面への細胞パターンの形成方法によって作成可能である細胞パターン。

【請求項32】 請求項1乃至請求項28のいずれかに記載される表面への細胞パターンの形成方法によって作成可能である表面上の細胞パターン。

【請求項33】 請求項1乃至請求項14のいずれかに記載される表面への細胞パターンの形成方法によって作

成可能である人工組織。

【請求項34】 請求項1乃至請求項14のいずれかに記載される表面への細胞パターンの形成方法によって作成可能である表面上の人工組織。

【請求項35】 請求項1乃至請求項28のいずれかに記載される表面への細胞パターンの形成方法によって作成可能である人工組織。

【請求項36】 請求項1乃至請求項28のいずれかに記載される表面への細胞パターンの形成方法によって作成可能である表面上の人工組織。

【請求項37】 請求項29乃至請求項32のいずれかに記載される細胞パターンの組み合わせ。

【請求項38】 請求項33乃至請求項36のいずれかに記載される人工組織の組み合わせ。

【請求項39】 請求項29乃至請求項32のいずれかに記載される細胞パターン及び請求項33乃至請求項36のいずれかに記載される人工組織の組み合わせ。

【請求項40】 センサ、技術的基板、組織、インプラント及び移植組織を含む群から選ばれるデバイスにおける、請求項29乃至請求項32のいずれかに記載の細胞パターン、及び／又は請求項33乃至請求項36のいずれかに記載の人工組織、及び／又は請求項37又は請求項38のいずれかに記載の組み合わせの使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、表面への細胞のパターンの形成方法、細胞のネットワーク及びそれに基づいた組織に関する。

【0002】

【従来の技術】同一種類で他の細胞に関する挙動及び空間的組成をより理解するために、様々な種類の細胞の機能を研究するためには、厳密に制御された条件下で細胞を培養できるようにする必要がある。細胞成長を誘導するように予めパターンされた基板上で、当該基板上のパターンに沿って細胞を培養及び成長させる実験が、2年間続けられた。

【0003】上記の実験は、短期的には、生物超小型電子回路を作製するための生きた細胞を組み込んだ、微小な生物電子デバイスの構築を可能とするという目的の下で為されたものである。この研究の長期的なもう1つの目的は、生物体内へ移植される移植片として好適な人工組織の作製を可能とすることであり、これについては、機能不全の組織と同種類の生体由来の組織に取って代わるものとなるかもしれない。また、この研究の3番目の目的は、細胞の特別な配列でこれらのデバイスの外側を「マスク」することによって、移植組織及び／又はインプラントの融合を促進することである。この特別な配列とは、細胞の化学的及び免疫学的性質、及びデバイスが導入される生物体内の部位に適合する配列である。

【0004】その程度までの細胞の培養、すなわち、特

定の所期のパターンを示す培養を実現する1つの方法としては、前もって細胞の成長を促進させる「誘導」分子のパターンが作られた表面にそって、細胞を成長させることが挙げられる。なお、この表面には、細胞の成長を促進しない領域が存在する。細胞成長促進分子としては、様々な種類のものが用いられる。

【0005】Mrksichらは、金基板への細胞の付着を制御するために、アルカンチオレートのパターンを用いた(1996, PNAS USA, 93, 10775-10778; 1997, Exp. Cell Res., 235, 305-313)。適当な末端のアルカンチオレートを選択することにより、彼らは細胞成長を促進する領域及び細胞成長を阻害する領域を作り出すことに成功した。Coreyらは、様々な値で線幅、交差間距離及び節の径を有するポリリジンの格子を残すように、選択的なレーザーアブレーションを行うことにより、ポリリジンコートされたカバーガラス上に神経細胞をパターンした(1991, J. Neurosci. Res., 30, 300-307)。

【0006】Matsuzawaらは、基板上に、ラミニンのB2鎖の神経突起伸長促進ドメインに由来する合成ペプチドを化学的に付着させた(1996, J. Neurosci. Meth., 69, 189-196)。また、Matsudaらは、様々な種類の他のペプチドを固定化した(Matsuda et al., 1990, Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs; 36(3): M559-63)。また、Kleinらは、ラミニンのような細胞外基質タンパク質(ECM)を固定化した(1999, J. Mat. Sci. Mat. in Med; 10: 721-727)。

【0007】生体分子を表面に付着させ、さらにパターン化するために、クロスリンカー(Clemence et al., 1985, Bioconjugated Chem. 6: 411-417)、シランカップリング剤(Plueddemann E. 2 edn New York Plenum Press, 1991: 1-250)を含めて、様々な技術が用いられてきた。

【0008】近年、基板上に特異的なパターンでタンパク質を付着させる技術として、いわゆるマイクロコンタクトプリンティング(microcontact printing)技術が適用されている。この方法は、比較的単純であり、また、生体分子のパターン化に一般的に用いることができる

(Kumar et al., 1993, Appl. Phys. Lett., 63(14), 2002-2004)。この技術では、まず、シリコンエラストマー(ポリジメチルシロキサン, PDMS)を所望のパターンで鋳造することによってスタンプを作製し、その後、このスタンプに、転写される生体分子の溶液を塗布する。その後、「インク付けされた」スタンプを基板の表面に接触させると、生体分子が、予め付与されたパターンにて自己集合し、基板上にパターンが形成される。

【0009】Kumarら及びMrksichらは、金基板上にアルカンチオールをスタンプすることにより、パターンを形成する上記方法を開発した(Mrksich et al. 1996, PNAS USA, 93, 10775-10778, Mrksich et al. 1997, Exp. Cell Res., 235, 305-313)。クロスリンカーとしてグル

タルアルデヒド(Branch et al. 1998, Med. Biol. Eng. Comput., 36, 135-141)及び硫化GMB S(Wheeler et al. 1999, J. Biomech. Eng., 121, 73-78)を用いたマイクロコンタクトプリンティング法により、ポリ-D-リジン及びラミニンを、アミノシランで変性されたガラス基板上に固定化した。マイクロコンタクトプリンティング(microcontact printing)技術は、神経細胞の誘導に用いられている(Wheeler et al. 1999, ibi d.; Branch et al. 2000, IEEE Transact. Biomed. Eng., 47, 3, 290-300)。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】ところで、上述した全ての研究では、主に神経細胞から分離した細胞の培養物を用いており、いくつかの事例においてだけパターンの形成に成功している。

【0011】しかしながら、このようにして形成された細胞のパターンが、自然界で実際に現れるものと同じ様相のものであるかどうかは不明であり、また、例えば生物電子デバイス等に対して有用性があるのかも不明である。

【0012】したがって、これらの研究から得られた結果は、例えば、器官内細胞の空間的な配列又は器官内の細胞間相互作用等に関しては、限定的にしか役に立たない。そのうえ、現在の生物電子インターフェースデバイス及び細胞改良インターフェースには、これらのデバイスを作製するに際して再現性に問題がある。つまり、基板上で細胞の付着及び成長を誘導し、そして完全に制御することは、いまだ不可能である。

【0013】現在の生物電子インターフェースデバイス及び細胞改良インターフェースでは、細胞がデバイスの基板上に直接培養されるので、全てのデバイスについて細胞の成長に成功するといった保証はない。したがって、多くのデバイス及び多くの培養スターターには、培養後に有益な細胞ネットワークが基板上に実際に現れることが確実に要求される。

【0014】インプラントに関する問題としては、これらのインプラントは、たいていの場合、生体適合性が限られていることが挙げられる。これは、インプラントの適合性の悪さ、すなわちホストによる拒絶反応、又は単に基板の毒性による。器官内の細胞の空間的配置に模倣させた細胞パターンに沿って細胞を並べることで、インプラントの生体適合性を確実に向上させることができる。

【0015】そこで本発明はこのような従来の実情に鑑みて提案されたものであり、本発明の第1の目的は、従来にない方法で、表面上での正確な細胞の成長を制御及び誘導可能とすることである。また、本発明の他の目的は、有益なデバイスを与える培養スターター又は基板の数を減少させることにより、生物電子デバイスの生産にかかる労力を抑制することである。また、本発明の他の

10

20

30

40

50

目的は、インプラント及び移植組織の生体適合性を向上させることである。

#### 【0016】

【課題を解決するための手段】上述の目的を達成するために、本発明の表面への細胞パターンの形成方法は、細胞パターンを形成しようとする表面に細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子を当該表面にパターン被着させることによって予備パターンする工程と、上記予備パターンされた表面上に細胞を培養することによって上記表面上に細胞パターンを形成する工程とを有し、上記細胞が全体組織であることを特徴とする。

【0017】上述したような本発明に係る表面への細胞パターンの形成方法では、細胞パターンを培養する表面を予備パターンすることで、表面上での正確な細胞の成長の制御及び誘導が可能となる。

【0018】また、上述の目的を達成するために、本発明の表面へのパターンの形成方法は、細胞パターンを形成しようとする表面に、細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子を当該表面にパターン被着させることによって予備パターンする工程と、上記予備パターンされた表面上に細胞を培養することによって、上記表面上に細胞パターンを形成する工程と、上記表面上に形成された上記細胞パターンを、その後、第2の表面へ転写する転写工程を有し、上記細胞が全体組織及び解離された細胞を含む群から選択されるものであることを特徴とする。

【0019】上述したような本発明に係る表面へのパターンの形成方法では、細胞パターンを培養する表面を予備パターンすることで、表面上での正確な細胞の成長の制御及び誘導が可能となり、その転写により正確な細胞パターンの再現が可能になる。

【0020】また、上述した本発明の目的は、転写段階を除いて、上述した本発明の方法により生産可能な細胞のパターン及び／又は人工組織によって達成される。さらにまた、本発明の目的は、転写段階を除いて、上述した本発明の方法により生産可能な、表面上の細胞のパターン及び／又は人工組織によって達成される。また、本発明の目的は、転写段階及びそれについての様々な実施形態を含む、上述した本発明の方法により生産可能な、細胞のパターン及び／又は人工組織によって達成される。また、本発明の目的は、転写段階及びそれについての様々な実施形態を含む、上述した本発明の方法により生産可能な、表面上の細胞のパターン及び／又は人工組織によって解決される。

【0021】また、本発明の目的は、本発明の細胞のパターンの組み合わせによって達成される。また、本発明の目的は、本発明の人工組織の組み合わせによって達成される。また、本発明の目的は、本発明の細胞パターン及び人工組織の組み合わせによって達成される。「細胞パターンの組み合わせ」という用語は、いかなる細胞パ

ターンの空間的配置も含むことを意味し、この細胞パターンは互いに近接している。「人工組織の組み合わせ」についても同様である。

【0022】さらにまた、本発明の目的は、センサ、技術的基板 (technical substrate)、組織、インプラント及び移植組織を含む群から選ばれるデバイスにおける、本発明に従った細胞のパターン、及び／又は人工組織、及び／又は組み合わせの使用によって達成される。

#### 【0023】

【発明の実施の形態】以下、本発明を適用した表面上の細胞のパターンの形成方法、細胞のネットワーク及びそれに基づいた組織について、図面を参照しながら詳細に説明する。

【0024】本発明者らは、本発明を適用することで、多くの最適なパターン上に、器官の組織切片の細胞を処理できることを明らかにした。すなわち、本発明の細胞パターンの形成方法は、細胞パターンを形成しようとする表面に細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子を当該表面にパターン被着させることによって予備パターンする工程と、上記予備パターンされた表面上に細胞を培養することによって上記表面上に細胞パターンを形成する工程とを有する。

【0025】ここで、上記細胞は全体組織である。そして、当該全体組織は生物の組織体由来のものであることが好ましい。具体的には、上記全体組織が、脳、肝臓、腎臓、筋肉、皮膚、骨、肺及び心臓を含む群から選ばれる器官由来のものであることが好ましい。また、上記細胞が、器官の組織切片であることが好ましい。これらの器官の組織切片は、器官の組織切片が器官内での細胞の配列を模倣する点で、器官適合性を有する (organotypic) ものであることが好ましい。また、上記細胞は、脳の組織切片であることが好ましい。

【0026】また、上記予備パターンされた表面に付着した上記細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子のパターンは、細胞の成長及び移動の誘導を可能とし、そして、上記細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子のパターンが、器官の細胞の配列を模倣するものであることが好ましい。さらに、上記細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子のパターンは、筋 (line) 及び節 (node) を有する構造を有し、ここで、上記筋の幅が  $1\mu\text{m}$  ~  $8\mu\text{m}$  の範囲であり、上記節の直径が  $1\mu\text{m}$  ~  $30\mu\text{m}$  の範囲であることが好ましく、上記筋の幅が  $1\mu\text{m}$  ~  $6\mu\text{m}$  の範囲であり、上記節の直径が  $8\mu\text{m}$  ~  $16\mu\text{m}$  の範囲であることがより好ましく、上記筋の幅が  $2\mu\text{m}$  ~  $4\mu\text{m}$  の範囲であり、上記節の直径が  $10\mu\text{m}$  ~  $14\mu\text{m}$  の範囲であることが最も好ましい。

【0027】上記細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子のパターンは、ポリペプチド、ポリエチレンイミン及びポリスチレンを含む群から選ばれる物質の少なくとも1層によって形成されることが好ましい。ここ

10

20

30

40

50

で、上記ポリペプチドが、細胞外タンパク質、ポリーリジン及びポリーオルニチンを含む群から選択され、上記細胞外タンパク質が、ラミニン及びフィブロネクチンを含む群から選択されることが好ましい。

【0028】以上説明したように、本発明では広範な全体組織から得られた細胞を用いることで、従来は困難であった、例えば格子状 (grid) 等のほぼ完全な細胞のパターンを実現することができた。全体組織から得られる組織切片を使用することは、表面の層は別として、従来に比べて機械的なダメージが小さくなること及びその組織の構成が維持されるという点で、分離された細胞を用いた培養よりも多くの利点がある。その後パターン化された細胞は、最初の組織切片の細胞の相対的な位置を反映したものとなる。

【0029】本発明を用いることにより、例えばグリッド及び／又は筋形状等のECMタンパク質の構造で培養された、例えば、脳幹組織切片からの神経細胞、神経突起及び糸状仮足を安定して成長させることができる。表面上の、細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子の適当なパターンを選択することによって、いかなる所望の細胞パターンも実現することができる。

【0030】さらにまた、本発明者らは、上述のようにして得られた、ほぼ完全な細胞パターンを処理することにより、これらのパターンを所望の他の表面上に容易に転写することに成功した。

【0031】すなわち、本発明に係る表面上のパターンの形成方法は、細胞パターンを形成しようとする表面に、細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子を当該表面にパターン被着させることによって予備パターンする工程と、上記予備パターンされた表面上に細胞を培養することによって、上記表面上に細胞パターンを形成する工程と、上記予備パターンされた表面上に形成された上記細胞パターンを、その後、第2の表面へ転写する転写工程とを有し、上記細胞が全体組織及び解離された細胞を含む群から選択されるものである。

【0032】ここで、上記転写工程が、

- a) マトリクスに上記細胞パターンを埋め込む手順と、
- b) 上記予備パターンされた表面から、上記細胞パターンを含む上記マトリクスを引き上げる手順と、
- c) 上記マトリクスに埋め込まれた上記細胞パターンを、上記第2の表面に接触させる手順とを含むことが好ましい。

【0033】具体的には、上記転写工程が、さらに、

- d) 上記マトリクスから、上記細胞パターンを離型する手順と、
- e) 上記細胞パターンから、上記マトリクスを除去する手順とを含むことが好ましい。

【0034】上記マトリクスは、細胞と適合性があることが好ましい。細胞と適合性があるとは、用いられる細胞の生存能力を妨げないということである。上記マトリ

クスは、アガロース、フィブリン、コラーゲン及びセロロースを含む群から選ばれる材料からなることが好ましい。具体的には、上記マトリクスは、硬化可能な材料からなり、上記硬化可能な材料が、アガロースを含む群から選ばれることが好ましい。この場合には、アガロースが液体の状態で細胞パターンを注入し、その後冷却することで硬化する。

【0035】また、上記マトリクスとして、ゲルを形成可能な材料を用いることもできる。上記ゲルを形成可能な材料が、フィブリノゲン及びコラーゲンを含む群から選ばれることが好ましい。フィブリノゲンは、トロンビンの添加によって、フィブリンのゲル形成を促進する。フィブリンのゲルを形成する方法は、例えば、Schense et al., 2000, Nature Biotechnology, 18, 415-419及びYe et al., 2000, European Journal of Cardio-thoracic Surgery, 17, 587-591に記載されており、これらの記載も参照として本明細書の記載に含める。コラーゲンのゲルは、コラーゲンの冷たい中性溶液を加熱することによりコラーゲン分子が自己集合して形成される。このような方法は、例えば、O'Connor et al., 2000, Biosensors and Bioelectronics, 14, 871-881, に記載されており、これらの記載も参照として本明細書の記載に含める。

【0036】細胞パターンが転写される上記第2の表面は、生物電子デバイスの表面、センサ、電子素子、組織、インプラント及び移植組織を含む群から選ばれる。

「センサ」は、特に、バイオセンサ、光学的センサを含む。「電子素子」としては、例えば、電界効果トランジスタ、多極アレイ (multi-electrode array) 及びその他同種類のものが挙げられる。移植組織としては、例えば、自原性 (autogenesis) (ドナーと受容者が同一)、同質遺伝性 (syngenous) (遺伝的にドナーと受容者が同一)、同種間性 (allogenous) (ドナーと受容者が同じ種に属する)、及び異種間性 (xenogenous) (ドナーと受容者が異なる種に属する) 等、公知のいかなる形態のものが適用可能である。

【0037】具体的には、上記埋め込み工程が、

- a a) 液体状の上記マトリクスで、上記細胞パターンの一部又は全体を被覆する手順と、
- a b) 上記マトリクスを形成する手順とを有することが好ましい。

【0038】上記マトリクスの形成は、ゲル転移温度以上に温度を上昇させること、及び／又は少なくとも1つのゲル誘導要素の添加により行われることが好ましい。ここで上記ゲル誘導要素が、トロンビン及び他の血液凝固因子を含む群から選ばれることが好ましい。この方法の改良型、例えばX因子等の血液凝固カスケードからの様々な因子と組み合わせてプロトロンビンを添加する方法も、本発明の範囲内である。

【0039】上記マトリクスからの上記細胞パターンの



離型は、酵素による分解及び／又はゲル転移温度未満に温度を低下させることによって行われることが好ましい。

【0040】上述したように、本発明の細胞パターンの転写は、例えば、細胞の生存能力を妨害しないという意味で生体適合性のある材料からなるマトリクスに、細胞パターン又は人工組織を埋め込むことによって行われる。本発明によれば、全てのマトリクスは、その性質に拘わらず、すでに表面上に形成された細胞又は人工組織のパターン上に集合する。これは、本発明によれば、細胞及び人工組織のパターンの形成後においてのみ、マトリクスがパターン形成されるということを意味する。続いて、ゲルを用いることによって、この細胞パターンを他の場所へと転写する。続いて、例えばゲル転移温度未満に温度を下げることで、酵素的な分解、その他の方法等によって、このマトリクスを除去する。

【0041】本発明では、完全な細胞パターンだけをこれらデバイスの表面に転写して用いることで、生物電子デバイスの生産をより経済的にするとともに、これらのデバイスの特性の正確な制御が可能となる。完全な細胞パターンが形成されると、この細胞パターンをマトリクスを用いて固定して、さらに基板から剥離し、それ自身では細胞成長の最初の場となる基板としては不適当な、電界効果トランジスタ等のようなバイオセンサ上などに転写することができる。

【0042】「予備培養された状態 (pre-cultured-situation)」を用いる本発明によれば、有用な細胞パターンだけが用いられ、そしてその細胞パターンがデバイス上に転写される。そして、このような操作により、要求される多くのデバイスをよりよく制御することができる。これは、これまで言及した全ての他の応用例、考えられる応用例についても広く当てはまる。

【0043】この「特別あつらえてないアプローチ (off-the-shelf-approach)」は、デバイスの入手が限られているとき、デバイスそれ自体は細胞成長及び培養にあまり適さないとき、又はこれらのデバイス上での細胞の操作が、不可逆的なダメージを細胞に与えるときに非常に有用である。

【0044】この場合、予備パターン化された基板上に

成長する新たな細胞のパターンは、同じようなデバイス上に配置することができ、この特定のデバイスで行われるあらゆる種類の測定が再開される。或いはまた、あるデバイスで用いられた細胞パターンは、すなわち、細胞パターンをデバイスから外した状態で、無菌状態へ移すことができ、測定を行った後で、当該細胞パターンは、さらなる培養のために培養器へと戻される。

【0045】本発明者らは、器官適合性の全体組織の組み合わせと、表面上に注意深く予備パターンを形成することにより、極めて多様な細胞パターンを形成することに成功した。また、デバイスに依存するあらゆる要求に従って、さらに多くのパターンのデザインが可能となる。また、人工組織を作製することにも成功した。

【0046】細胞成長促進分子及び／又は細胞成長阻害分子を表面上に被着させることで、表面を予備パターンするために適当な技術として、マイクロコンタクトプリンティング (microcontact printing) 技術について以下の実験例に述べるが、本発明は、特にこの技術に限定されるものではない。表面を予備パターンするための技術として、他に例えばフォトリソグラフィ、リソグラフィ用マスクを用いたレーザーアブレーション技術等が挙げられるが、これらの技術も、本発明の範囲に含まれる。

【0047】なお、本発明は、明細書、特許請求の範囲及び／又は添付された図面に開示された本発明のそれぞれの特徴を別々に適用することもできるし、それらをあらゆる組み合わせで適用することもできる。いずれの形態においても本発明を実現することができる。

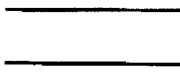

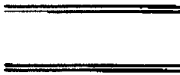


【0048】〈実験例〉本発明について行った実験例について述べるが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

#### 【0049】実験例1

本発明の方法を用いて、表面上に多くの種類のラミニンのパターンを形成した。これらのパターンは、細胞成長を厳密に制御することで形成することができる。これらのパターンを表1～表3に示す。


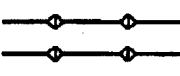



#### 【0050】

#### 【表1】

パターン	構造	寸法	概要
1	筋 (line)	筋幅 : $2\mu\text{m}$ 間隔 : $100\mu\text{m}$	
2	筋	筋幅 : $4\mu\text{m}$ 間隔 : $100\mu\text{m}$	
3	筋	筋幅 : $6\mu\text{m}$ 間隔 : $100\mu\text{m}$	
7	節を有する格子	筋幅 : $2\mu\text{m}$ 節径 : $10\mu\text{m}$ メッシュ : $100\times 50\mu\text{m}$	
8	節を有する格子	筋幅 : $4\mu\text{m}$ 節径 : $12\mu\text{m}$ メッシュ : $100\times 50\mu\text{m}$	



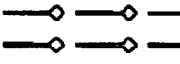
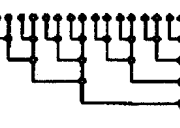
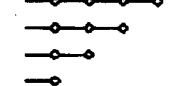
【0051】

\* \* 【表2】

パターン	構造	寸法	概要
9	節を有する格子	筋幅 : $6\mu\text{m}$ 節径 : $14\mu\text{m}$ メッシュ : $100\times 50\mu\text{m}$	
10	節を有する筋	筋幅 : $2\mu\text{m}$ 節径 : $20\mu\text{m}$ 筋の間隔 : $50\mu\text{m}$ 節の間隔 : $100\mu\text{m}$	
11	節を有する筋	筋幅 : $4\mu\text{m}$ 節径 : $22\mu\text{m}$ 筋の間隔 : $50\mu\text{m}$ 節の間隔 : $100\mu\text{m}$	
12	節を有する筋	筋幅 : $2\mu\text{m}$ 節径 : $10\mu\text{m}$ 筋の間隔 : $50\mu\text{m}$ 節の間隔 : $100\mu\text{m}$	
13	節を有する格子	筋幅 : $2\mu\text{m}$ 節径 : $20\mu\text{m}$ メッシュ : $100\times 50\mu\text{m}$	

【0052】

【表3】

パターン	構造	寸法	概要
14	節を有する格子	筋幅 : 4 $\mu\text{m}$ 節径 : 22 $\mu\text{m}$ メッシュ : 100 $\times$ 50 $\mu\text{m}$	
15	節を有する格子	筋幅 : 6 $\mu\text{m}$ 節径 : 24 $\mu\text{m}$ メッシュ : 100 $\times$ 50 $\mu\text{m}$	
24	節及びギャップを有する格子	筋幅 : 4 $\mu\text{m}$ 節径 : 22 $\mu\text{m}$ ギャップ : 20 $\mu\text{m}$ メッシュ : 100 $\times$ 50 $\mu\text{m}$	
30	点線を有し縦横して増加する接続	筋幅 : 2 $\mu\text{m}$ 節径 : 20 $\mu\text{m}$ 点 : 5 $\mu\text{m}$ 筋の間隔 : 50 $\mu\text{m}$ 節の間隔 : 100 $\mu\text{m}$	
34	直列接続	筋幅 : 2 $\mu\text{m}$ 節径 : 20 $\mu\text{m}$ 筋の間隔 : 100 $\mu\text{m}$ 節の間隔 : 100 $\mu\text{m}$	

### 【0053】実験例2

・脳幹細胞と器官適合性を有する細胞の培養

発生15日齢～18日齢のSDラット (Sprague-Dawley rat) の胎児の脳全体を摘出した。このとき、脳脚を切開して取り出された、くちばし状の脳橋及び小脳を横断切断することによって延髄及び脳橋を除去した。そして、無菌状態の冷却されたpH7.4の脳幹組織切片培養基で、脳幹細胞組織切片の冠状切片 (coronal sections) を得た。マキルウェイン組織切断器を用いて切り取ったこれらの組織切片の厚さは250  $\mu\text{m}$ であった。

【0054】このようにして準備された組織切片 (通常、ラット脳幹細胞から約6～12組織切片得られる。) を、37℃、5%のCO<sub>2</sub> 雰囲気設定された培養器内に、最低4～5時間放置した。この保温培養によって、切り取られたことによってダメージを受けた細胞を、切り取られた組織切片の表面から分離させる。

【0055】この保温培養の後、当該組織切片を、表面を洗浄したスパチュラを用いて、ラミネンコートされた対照試料上、及びラミネンがパターンされたテスト基板上に載置した。このとき、組織切片にさらにダメージを与えないように気をつけなければならない。

【0056】G h w i l e r によって記載された方法とは異なり、組織切片を固定する際に、プラズマ凝固物又はコラーゲンは用いない。プラズマ凝固物又はコラーゲンのどちらの方法も、細胞の移動、特にECMパターン上での移動を妨げるからである。また、回転チューブ技術は不要である。

【0057】その代わりに、組織切片が表面から分離しないように、全ての培養皿において大量の培養基を添加した。培養2～3日後には、組織切片がかなり広範囲にわたって移動するので、より多くの培養基をこの段階で添加してもよい。

【0058】非神経細胞の増殖を阻害するために、有糸

20 分裂阻害剤であるシトシンβ-D-アラビノフラノシド (ARA-C、SIGMA C-6645) を、必要に応じて4日目又は5日目に添加した。ARA-Cを用いた場合、培養基は5日後～7日後に、ARA-Cを添加しない状態に戻った。

### 【0059】実験例3

・マイクロコンタクトプリンティング (Micro contact printing) 及び溶液

実験用のマイクロスタンプをフォトリソグラフィ及び成形によって作製した。実験用にデザインした種々の構造パターンを、電子ビームでクロムマスクに書き込んだ。そして、紫外線フォトリソグラフィ技術を用いて、厚さ0.6mmのシリコンウェハ (MEMC Electronic Materials, Germany) 上に、厚さ12.5  $\mu\text{m}$  のフォトレジスト層 (AZ 4562, Clariant GmbH, Germany) がスピニングされてなるマスター型を作製した。

【0060】引き続いて、10ml エッペンドルフ管内で55℃、48時間処理してシルガード182 (Dow Corning, Germany) を硬化させることにより、上記マスター型に逆状態の、ポリジメチルシロキサン (PDMS) のマイクロスタンプを作製した。マスター型を離型した後、110℃で1時間処理して、最終硬化を行った。

【0061】スタンプの親水性を向上させるために、最低24時間、PDMSスタンプを脱イオン水中に保持した。パターン形成を行う前に、スタンプを水から取り出し、70%エタノール浴中で1分間の滅菌を行った。

【0062】そして、スタンプを25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (～0.25  $\mu\text{M}$ ) のラミネン溶液中に30秒間浸すことによりインク付けを行った。その後、インクが付けられたスタンプを、穏やかな窒素空気流中で乾燥し、直ちに基板上に10秒間押しつけた。全ての実験において、基板

として、組織培養用ではないポリスチレン製の直径3 cmのペトリ皿 (Greiner Labortechnik, Germany) を用いた。

【0063】脳組織切片培養基は、20%~25%の胎児牛血清 (SIGMA, F7524) 及び4 mMのグルタミン (SIGMA, G7513) で補足されたHAM SF10 (SIGMA; G7513) から作製したものをを用いた。ラミニン (1243217, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) は、無菌のPBS中で再構成されたものである。

#### 【0064】実験例4

##### ・細胞パターンの実現

図1A~図1Dは、ラミニンコートされた組織培養プラスチック上における、器官適合性を有する (organotypic) 脳幹神経細胞の移動を示す図である。図1Aに示すように、培養3日目では、移動した神経細胞をはっきりと認識することができ、また、神経突起の成長がすでに始まっていた。図1Bに示すように、培養5日目では、これらの樹枝状突起及び神経突起は、かなりの長さに成長していた。13日目 (図1C) 及び20日目 (図1D) では、この神経突起は、グリア細胞及び他の非神経細胞の上に広く行き渡るネットワークを形成する全ての神経細胞と合流するようになった。

【0065】図2は、本発明の技術を用いて、神経突起の成長及び神経細胞の移動を誘導することの有効性を示す図である。用いたパターンには関係なく、ラミニンでパターンされた基板の脳幹組織切片は、神経突起の急速な成長を示した。そしてこの神経突起は、2週間以内にスタンプされたパターンの端まで伸び、2週間の終わりには神経突起は成熟して厚くなった。

【0066】図3及び図4は、細胞外基質タンパク質の様々な評価を示す図である。図3A及び図3Bに示すパターン1は、節 (node) の直径が10  $\mu$ mであり、筋 (line) の幅が2  $\mu$ mである。図3B及び図3Cに示すパターン2は、節の直径が10  $\mu$ mであり、筋の幅が4  $\mu$ mである。図3C及び図3Dに示すパターン3は、節の直径が10  $\mu$ mであり、筋の幅が6  $\mu$ mであった。図4A及び図4Bに示すパターン4は、節の直径が10  $\mu$ mであり、筋の幅が2  $\mu$ mであった。図4E及び図4Fに示すパターン5は、節の直径が10  $\mu$ mであり、筋の幅が2  $\mu$ mであった。図4F及び図4Gに示すパターン6は、節の直径が20  $\mu$ mであり、トラックが4  $\mu$ mであった。培養初期には、移動した神経細胞及び突起の成長プロセスは、全てのパターンにおいて殆ど重なり合うことなくはっきりと見えていた。これらの培養物は、少なくとも培養10日目までは成熟を続け、ラミニンでスタンプされたパターンの元の形状が識別可能であった。

【0067】図5乃至図7は、幅2  $\mu$ mの筋 (節の直径10  $\mu$ m) で殆ど完全なパターンが実現できること及び

完全な格子 (grid) 構造が形成されることを示す図である。パターン1の培養14日目における神経突起の成長を、図5では40倍、図6では100倍、図7では200倍と、倍率を次第に増して示す。この神経突起の完全なネットワークは、最小幅 (2  $\mu$ m) のパターンで得られた。図中の\*は、それらの対応する倍率における基板の同じポイントを示す。しかしながら、この特別なパターンでは、視覚的に確認できる神経細胞で実際にパターン上に移動したものは極めて少ない。つまり、そのパターンは、神経突起の成長によってのみ形成されるものである。節の径が10  $\mu$ m~14  $\mu$ mであり、筋の幅が2~4  $\mu$ mであるようなパターンが、神経細胞の制限に最も適していた。

【0068】筋幅を様々に変えて行った実験では、筋幅が6  $\mu$ mの場合に最もよく神経細胞の移動が生ることが示された。この筋幅では、神経突起の完全なネットワークは、マイクロコンタクトプリンティング (microcontact printing) 技術に使われる最初のスタンプ (直径10 mm) とほぼ同じ面積に広がっていた。細胞は、節 (node) に向かって移動する傾向があり (Klein et al., 1999, J. of Mat. Sci; Mat. in Med., 10, 721-729)、また、脳神経細胞を用いたときにも同じ現象が観察されることが知られている。節上に移動したこれらの神経細胞を、その後固定化する。数日間の培養の後、神経細胞の神経突起が成長し始め、単純な線状の神経細胞のネットワークを形成した。

#### 【0069】

【発明の効果】以上の説明からも明らかのように、本発明によれば、従来にはない方法で、表面上での正確な細胞の成長の制御及び誘導を可能にすることができる。また、本発明によれば、有益なデバイスを与える培養スタータ (starter cultures) 又は基板の数を減少させることにより、生物電子デバイスの生産にかかる労力を抑制可能とする。また、本発明によれば、インプラント及び移植組織の生体適合性を向上させることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】ラミニンコートされた組織培養プラスチック上の器官の機能を維持した状態 (organotypic) である脳幹神経細胞の移動を示す図であり、Aは培養3日目、Bは培養5日目、Cは培養13日目、Dは培養20日目の状態を示す図である。

【図2】ラミニンのトラック上に神経突起が成長した様子を示す図である。

【図3】細胞外基質タンパク質の様々な評価を示す図である。

【図4】細胞外基質タンパク質の様々な評価を示す図である。

【図5】パターン1の培養14日目における神経突起の成長を示す図であり、倍率40倍で示す図である。

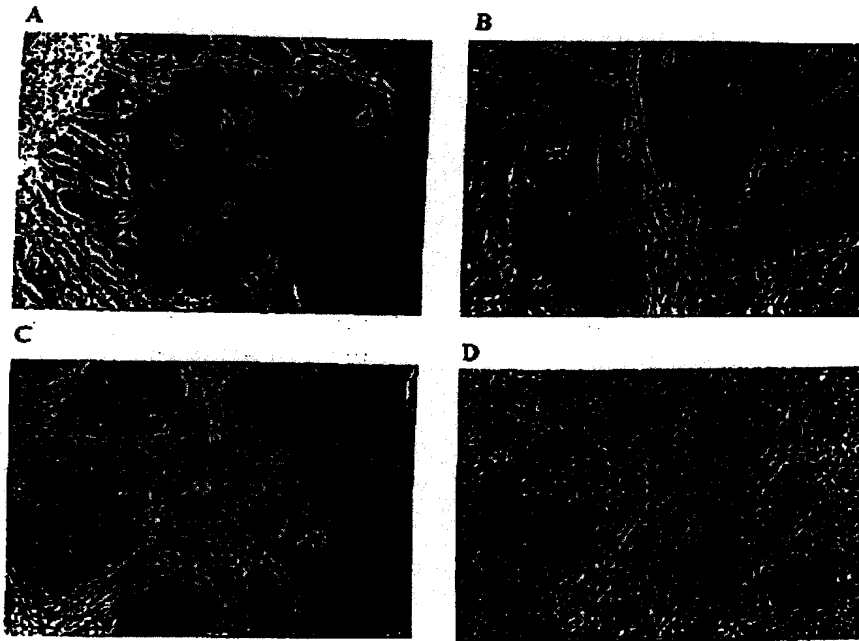
【図6】パターン1の培養14日目における神経突起の

成長を示す図であり、倍率100倍で示す図である。

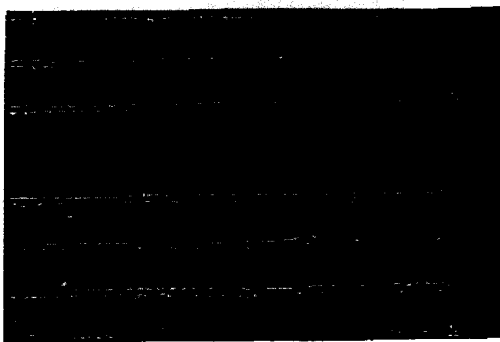
\* 成長を示す図であり、倍率200倍で示す図である。

【図7】パターン1の培養14日目における神経突起の\*

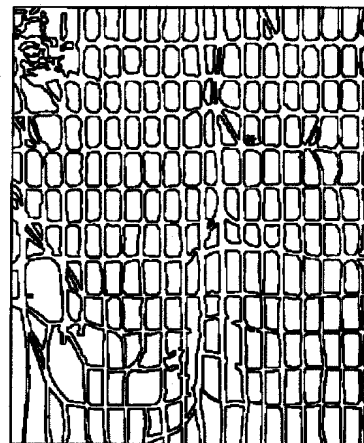
【図1】



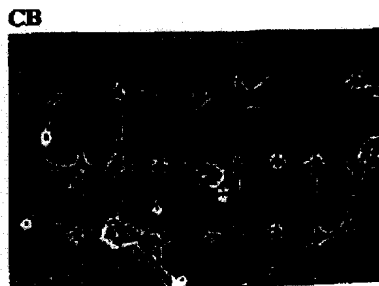
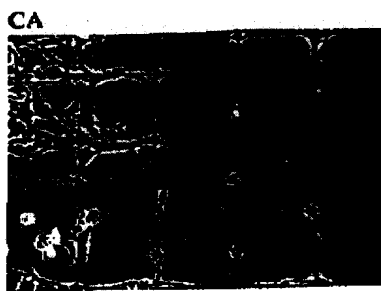
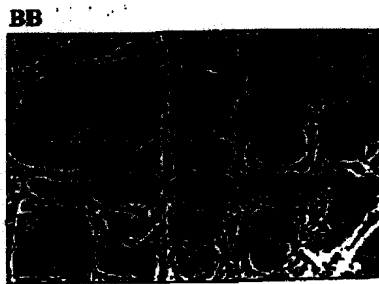
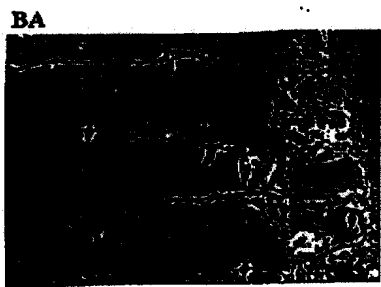
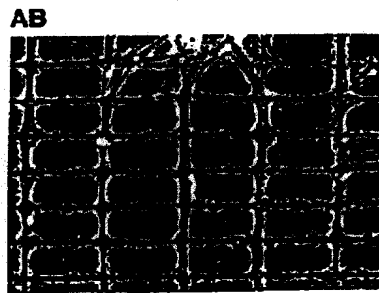
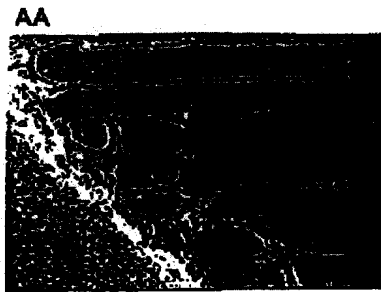
【図2】



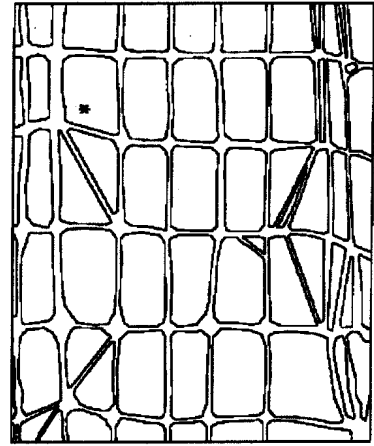
【図5】



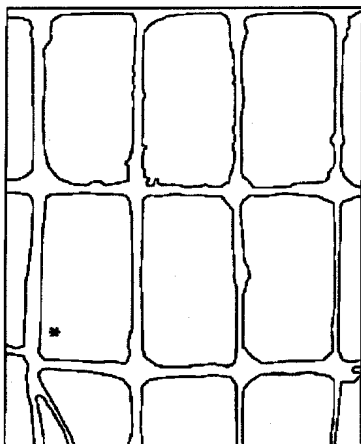
【図3】



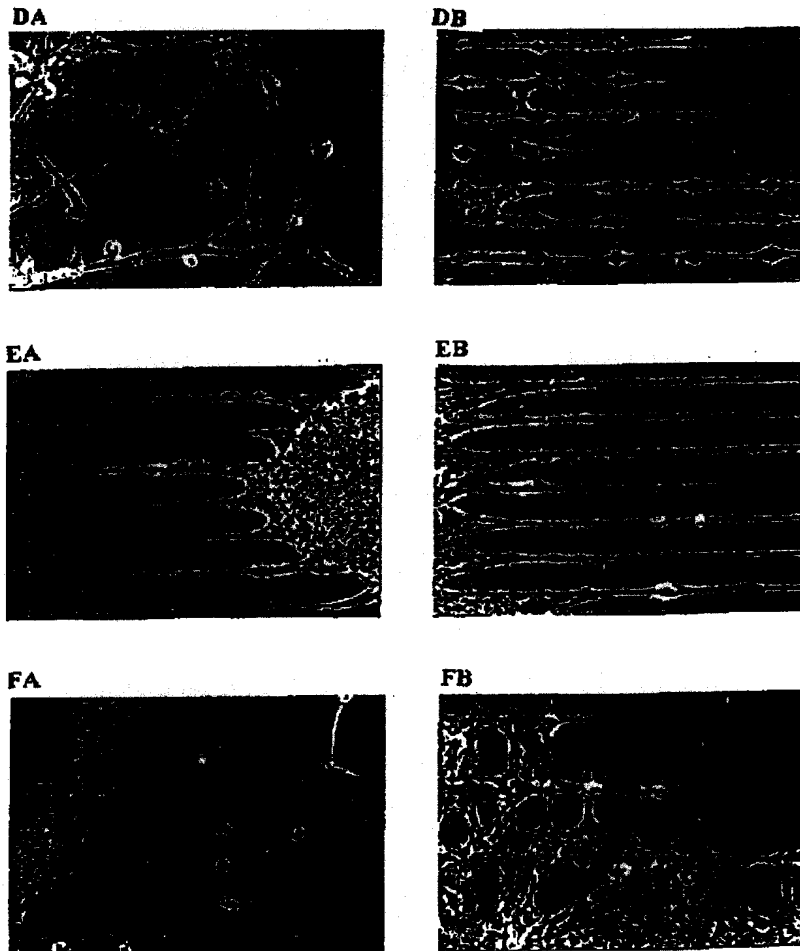
【図6】



【図7】



【図4】



フロントページの続き

(71)出願人 500382141

マックス プランク ゲゼルシャフト ツ  
ル フォルデルング デル ウィッセンシ  
ャフテン エー. ヴェー.

ドイツ連邦共和国 ディー-80539 ミュ  
ンヘン ホフガルテンシュトラッセ 8

(72)発明者 ネレス、ガブリエーレ

ドイツ連邦共和国 70327 シュトゥット  
ウガルトヘデルフィンガー シュトラッセ

61 ソニー インターナショナル (ヨー  
ロッパ) ゲゼルシャフト ミット ベシ  
ュレンクテル ハフツング アドバンスド  
テクノロジー センター シュトゥット  
ウガルト内

(72)発明者 安田 章夫

ドイツ連邦共和国 70327 シュトゥット  
ウガルトヘデルフィンガー シュトラッセ

61 ソニー インターナショナル (ヨー  
ロッパ) ゲゼルシャフト ミット ベシ  
ュレンクテル ハフツング アドバンスド  
テクノロジー センター シュトゥット  
ウガルト内

(72)発明者 クノッル、ラルフガング

ドイツ連邦共和国 55128 マインツ ア  
ッケルマンウエグ 10 マックス プラン  
ク インスティテュート フル ポリメル  
フォルシュング内

(72)発明者 オッフェンハウザー、アンドレアス  
ドイツ連邦共和国 55128 マインツ ア  
ッケルマンウェグ 10 マックス プラン  
ク インスティテュート フル ポリメル  
フォルシュング内

(72)発明者 ヨン、チー コング  
ドイツ連邦共和国 55128 マインツ ア  
ッケルマンウェグ 10 マックス プラン  
ク インスティテュート フル ポリメル  
フォルシュング内

(72)発明者 ラウアー、ラーズ  
ドイツ連邦共和国 55128 マインツ ア  
ッケルマンウェグ 10 マックス プラン  
ク インスティテュート フル ポリメル  
フォルシュング内

Fターム(参考) 4B065 AA90X BB19 BB25 BC41  
BC50 CA44  
4C081 BA12 BC01 CD34 EA01  
4C097 BB01 MM04



## 【外国語明細書】

## 1 Title of Invention

A method of forming a cell pattern on a surface, cellular networks and tissues based thereon

## 2 Claims

1. A method of forming a pattern of cells on a surface, said surface being prepatterned in having a pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules attached thereon, characterised in that cells are cultured on said prepatterned surface such that they form a pattern of cells on said surface, said cells being whole tissue.

2. A method according to claim 1 characterised in that said whole tissue is derived from an organism's body.

3. A method according to any of claims 1 - 2 characterised in that said whole tissue is derived from an organ selected from the group comprising brain, liver, kidney, muscle, skin, bone, lung and heart.

4. A method according to any of the preceding claims characterised in that said cells are organ slices.

5. A method according to claim 4 characterised in that said cells are brain slices.

6. A method according to any of the preceding claims characterised in that said pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules attached on said prepatterned surface allows for the guided growth and migration of cells.

7. A method according to claim 6 characterised in that said pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules mimics the arrangement of cells in an organ.

8. A method according to any of claims 1 - 7 characterised in that said pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules has a structure with lines and nodes.

9. A method according to claim 8 characterised in that said lines have a width in the range from 1 - 8 micrometers and said nodes have a diameter in the range from 1 - 30 micrometers.

10. A method according to claim 9 characterised in that said lines have a width in the range from 1 - 6 micrometers and said nodes have a diameter in the range from 8 - 16 micrometers.

11. A method according to claim 10 characterised in that said lines have a width in the range from 2 - 4 micrometers and said nodes have a diameter in the range from 10 - 14 micrometers.

12. A method according to any of the preceding claims characterised in that said pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules is formed by at least one layer of a substance selected from the group comprising polypeptide, polyethyleneimine and polystyrene.

13. A method according to claim 12 characterised in that said polypeptide is selected from the group comprising extracellular matrix proteins, poly-L-lysine and poly-ornithine.

14. A method according to claim 13 characterised in that said extracellular matrix proteins are selected from the group comprising laminin and fibronectin.

15. A method of forming a pattern of cells on a surface, said surface being prepatterned in having a pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules attached thereon, in particular according to any of the preceding claims, characterised in that cells are cultured on said prepatterned surface such that they form a pattern of cells on said surface, said cells being selected from the group comprising whole tissue and dissociated cells, further characterised in that said pattern of cells, after having been formed on said prepatterned surface, is transferred to a second surface in a transfer step.

16. A method according to claim 15 characterised in that said transfer step comprises the sequence:

- a) embedding said pattern of cells in a matrix,
- b) lifting said matrix including said pattern of cells from said prepatterned surface,
- c) contacting said pattern of cells embedded in said matrix with said second surface.

17. A method according to any of claims 15-16 characterised in that said transfer step further comprises the sequence:

- d) releasing said pattern of cells from said matrix,
- e) removing said matrix from said pattern of cells.

18. A method according to any of claims 16-17 characterised in that said matrix is a cell-compatible matrix.

19. A method according to any of claims 16-18 characterised in that said matrix is a matrix composed of a material selected from the group comprising agarose, fibrin, collagen and cellulose.

20. A method according to any of claims 16-18 characterised in that said matrix is a matrix composed of a curable material.

21. A method according to claim 20 characterised in that said curable material is selected from the group comprising agarose.

22. A method according to any of claims 16-18 characterised in that said matrix is a matrix composed of a material capable of forming a gel.

23. A method according to claim 22 characterised in that said material capable of forming a gel is selected from the group comprising fibrinogen and collagen.

24. A method according to any of claims 15-21 characterised in that said second surface is selected from the group comprising surfaces of bioelectrical devices, sensors, electrical components, tissues, implants and transplants.

25. A method according to any of claims 16 – 24 characterised in that said embedding is achieved by

- aa) partially or fully covering said pattern of cells with said matrix in a liquid form,
- and
- ab) forming said matrix.

26. A method according to claim 25 characterised in that forming said matrix (ab)) is achieved by increasing the temperature above the gel-transition temperature and/or addition of at least one gel-inducing component.

27. A method according to claim 26 characterised in that said gel-inducing component is selected from the group comprising thrombin and other blood-coagulation factors.

28. A method according to any of claims 17 – 27 characterised in that said releasing said pattern from said matrix is achieved by enzymatic degradation and/or lowering the temperature below the gel-transition temperature.

29. A pattern of cells producible by a method according to any of claims 1 – 14.

30. A pattern of cells on a surface producible by a method according to any of claims 1 – 14.

31. A pattern of cells producible by a method according to any of claims 1 – 28.

32. A pattern of cells on a surface producible by a method according to any of claims 1 – 28.

33. An artificial tissue producible by a method according to any of claims 1-14.

34. An artificial tissue on a surface producible by a method according to any of claims 1-14.

35. An artificial tissue producible by a method according to any of claims 1-28.

36. An artificial tissue on a surface producible by a method according to any of claims 1-28.

37. A combination of patterns of cells according to any of claims 29-32.
38. A combination of artificial tissues according to any of claims 33-36.
39. A combination of patterns of cells according to any of claims 29-32 and artificial tissues according to any of claims 33-36.
40. Use of a pattern of cells according to any of claims 29 - 32 and/or an artificial tissue according to any of claims 33-36 and/or a combination according to any of claims 37-38 in a device selected from the group comprising sensors, technical substrates, tissues, implants and transplants.

### 3 Detailed Description of Invention

In order to be able to study the functions of cells of various types so that their behaviour and spatial organisation in association with other cells of the same type can be better understood, it is necessary to be able to culture the cells under precisely controlled conditions. For a couple of years attempts have been undertaken to culture and grow cells on prepatterned substrates which guide the cell growth along the patterns on this substrate. This was done with the hindsight that, one day, one should be able to thereby build miniature biological electronic devices, incorporating live cells to make up a biological microcircuit. Another long-term goal of these studies is the capability of making artificial tissues suitable for implanting into an organism's body, thereby possibly replacing natural tissue of the same kind which is malfunctioning. A third aim of these studies is to be able to facilitate the integration of transplants and/or implants by "masking" the outer parts of these devices with a special array of cells which by their chemical and immunological nature as well as by their arrangement fit into the organism's body at the site in which the device is to be introduced.

One way of achieving cultures of cells to that extent, i. e. cultures which show a specific intended special pattern is to grow the cells along surfaces on which, previously, patterns of a "guiding" molecule which promotes cell growth have been created, and where there are regions which do not promote cell growth. Various cell growth promoting molecules have been used:

Mrksich et al. (1996, PNAS USA, 93, 10775-10778; 1997, Exp. Cell Res., 235, 305-313) used alkanethiolate patterns on gold to control cell attachment to these substrates. By choosing an appropriately terminated alkanethiolate they succeeded in creating regions of cell growth promotion and cell growth inhibition. Corey et al. (1991, J. Neurosc. Res., 30, 300-307) managed to pattern neurons on polylysine-coated glass cover slips patterned by selective laser ablation so as to leave grids of polylysine with varying line widths, intrasection distances and nodal diameters.

Matsuzawa et al. (1996, *J. Neurosci. Meth.*, 69, 189-196) chemically attached a synthetic peptide derived from a neurite-outgrowth-promoting domain of the B2 chain of laminin.

Others immobilised various other peptides (Matsuda et al., 1990, *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*; 36 (3): M559-63), or extracellular matrix proteins (ECM) such as laminin (Klein et al., 1999, *J. Mat. Sci.: Mat. in Med.*; 10: 721 - 727).

Various techniques for attaching and patterning biomolecules on a surface have been used, including crosslinkers (Clemence et al., 1985, *Bioconjugated Chem.* 6: 411 - 417), silane coupling agents (Plueddemann E. 2 edn New York Plenum Press, 1991: 1 - 250), amongst others. One recently and successfully applied technique to attach proteins in a specific pattern to a substrate is the so-called microcontact printing technique. It is comparatively simple and universal for patterning biomolecules (Kumar et al., 1993, *Appl. Phys. Lett.*, 63 (14), 2002 - 2004). In this technique a stamp is produced by casting a silicon elastomer (polydimethyl siloxane, PDMS) in the desired pattern which is then coated with a solution of the biomolecule to be transferred. After contacting the "inked" stamp with the substrate surface the biomolecules self-assemble in the pre-given pattern. Kumar et al. and Mrksich et al. developed this method of producing patterns by stamping alkane thiols on gold substrates (Mrksich et al. 1996, *PNAS USA*, 93, 10775 - 10778, Mrksich et al. 1997, *Exp. Cell. Res.* 235, 305 - 313). Poly-D-lysine and laminin have been immobilised using microcontact printing on amino silane derivatised glass substrates with glutaraldehyde as a cross linker (Branch et al. 1998, *Med. Biol. Eng. Comput.*, 36, 135 - 141) and sulfo-GMBS (Wheeler et al. 1999, *J. Biomech. Eng.*, 121, 73 - 78), and the technique of microcontact printing has been used in neuronal cell guidance (Wheeler et al. 1999, *ibid.*; Branch et al. 2000, *IEEE Transact. Biomed. Eng.*, 47, 3, 290 - 300).

All of the aforementioned studies used dissociated cell cultures, mainly of neural origin and achieved successful pattern formation only in some cases. It is not clear, however, whether the patterns of cells thus formed do represent a true picture as it would appear in nature nor whether they are of any use, e. g. for bioelectronic devices. Therefore, the conclusions to be drawn from these studies, e. g. in respect of the spatial arrangement of cells within an organ or the interactions between cells within an organ are only of limited use. Likewise, if one looks at current bioelectronic interface devices and cell modified interfaces there is a problem of reproducibility in creating these devices. It is still not possible to fully control and guide cell

attachment and growth on surfaces. Since with current bioelectronic interface devices and cell modified interfaces, the cells are being cultured directly onto the surface of these devices, there is no guarantee that growth on every device will be successful, and therefore a lot of devices and a lot of starter cultures are required just to ensure that some substrates, after culturing, may actually display a cellular network which is useful. A related problem concerning implants is that these are often only of limited biocompatibility due to their bad integration, a rejection by the host or simply the toxicity of the substrates. Lining them with a pattern of cells which mimic the spatial organisation of cells within an organ would certainly enhance the biocompatibility of implants.

Accordingly, one object of the present invention is to be able to control and guide cell growth on surfaces in a precise and hitherto unheard of manner. Another object of the present invention is to be able to limit the efforts in producing bioelectronic devices by reducing the number of starter cultures/substrates that will give a successful device. Another object of the present invention is to enhance that biocompatibility of implants and transplants.

The object is solved by

a method of forming a pattern of cells on a surface, said surface being prepatterned in having a pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules attached thereon, characterised in that cells are cultured on said prepatterned surface such that they form a pattern of cells on said surface, said cells being whole tissue.

Preferably said whole tissue is derived from an organism's body.

In one embodiment said whole tissue is derived from an organ selected from the group comprising brain, liver, kidney, muscle, skin, bone, lung and heart.

It is preferred that said cells are organ slices.

These organ slices are preferably organotypic in that they mimic the arrangement of cells within an organ.

Preferably said cells are brain slices.

In one embodiment said pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules attached on said prepatterned surface, allows for the guided growth and migration of cells, wherein preferably, said pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules mimics the arrangement of cells in an organ.

It is preferred that said pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules has a structure with lines and nodes, wherein preferably, said lines have a width in the range from 1 - 8 micrometers and said nodes have a diameter in the range from 1 - 30 micrometers, more preferably, said lines have a width in the range from 1 - 6 micrometers and said nodes have a diameter in the range from 8 - 16 micrometers, and most preferably, said lines have a width in the range from 2 - 4 micrometers and said nodes have a diameter in the range from 10 - 14 micrometers.

In one embodiment said pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules is formed by at least one layer of a substance selected from the group comprising polypeptide, polyethyleneimine and polystyrene wherein, preferably, said polypeptide is selected from the group comprising extracellular matrix proteins, poly-L-lysine and poly-ornithine, wherein, more preferably, said extracellular matrix proteins are selected from the group comprising laminin and fibronectin.

The object is also solved by a method of forming a pattern of cells on a surface, said surface being prepatterned in having a pattern of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules attached thereon, in particular according to any of the preceding claims, characterised in that cells are cultured on said prepatterned surface such that they form a pattern of cells on said surface, said cells being selected from the group comprising whole tissue and dissociated cells, further characterised in that said pattern of cells, after having been formed on said prepatterned surface, is transferred to a second surface in a transfer step. wherein preferably, said transfer step comprises the sequence:

- a) embedding said pattern of cells in a matrix,
- b) lifting said matrix including said pattern of cells from said prepatterned surface,
- c) contacting said pattern of cells embedded in said matrix with said second surface.



In one embodiment said transfer step further comprises the sequence:

- d) releasing said pattern of cells from said matrix,
- e) removing said matrix from said pattern of cells.

Preferably said matrix is a cell-compatible matrix.

A cell-compatible matrix is a matrix that does not interfere with the viability of cells used.

It is preferred that said matrix is a matrix composed of a material selected from the group comprising agarose, fibrin, collagen and cellulose.

In one embodiment said matrix is a matrix composed of a curable material, wherein preferably, said curable material is selected from the group comprising agarose.

In one embodiment said matrix is a matrix composed of a material capable of forming a gel, wherein, preferably, said material capable of forming a gel is selected from the group comprising fibrinogen and collagen.

In one embodiment said second surface is selected from the group comprising surfaces of bioelectrical devices, sensors, electrical components, tissues, implants and transplants.

"Sensors" are meant to include biosensors, optical sensors, amongst others. "Electrical components" can, for example, be field-effect transistors, multi-electrode arrays and the like. Transplants can be of any form known, i.e. autogenous (donor and receptor identical), syngenous (genetically identical donor and receptor), allogenuous (donor and receptor belong to the same species) and xenogenous (donor and receptor belong to different species).

In one embodiment said embedding is achieved

- aa) partially or fully covering said pattern of cells with said matrix in a liquid form,
- and
- ab) forming said matrix.

It is preferred that forming said matrix (ab)) is achieved by increasing the temperature above the gel-transition temperature and/or addition of at least one gel-inducing component,

wherein, preferably, said gel-inducing component is selected from the group comprising thrombin and other blood-coagulation factors.

It is preferred that said releasing said pattern from said matrix is achieved by enzymatic degradation and/or lowering the temperature below the gel-transition temperature.

The object of the present invention is also solved by a pattern of cells and/or an artificial tissue producible by a method according to the present invention up to, but exclusive of the transfer step.

The object is furthermore solved by a pattern of cells and/or an artificial tissue on a surface producible by a method according to the present invention up to, but exclusive of the transfer step.

It is also solved by a pattern of cells and/or an artificial tissue producible by the method according to the present invention including the transfer step and various embodiments thereof.

The object is also solved by a pattern of cells and/or an artificial tissue on a surface producible by the method according to the present invention including the transfer step and various embodiments thereof.

The object of the present invention is also solved by a combination of patterns of cells according to the present invention.

The object is furthermore solved by a combination of artificial tissues according to the present invention.

It is also solved by a combination of patterns of cells and artificial tissues according to the present invention.

The term "combination of patterns of cells" is meant to include any spatial arrangement of patterns of cells wherein these patterns are in proximity to each other. The same applies to "combination of artificial tissues".

The object is furthermore solved by the use of a pattern of cells and/or an artificial tissue and/or a combination according to the present invention in a device selected from the group comprising sensors, technical substrates, tissues, implants and transplants.

The inventors, in making the present invention, could clearly demonstrate that it is possible to manipulate cells of organ slices onto a number of best suited patterns. In using cells from whole tissue, extended, almost perfect patterns of cells, e. g. grids, could be achieved which were hitherto impossible. The use of whole tissue slices has many advantages over dissociated cultures in that, apart from the superficial layer, relatively minimal mechanical damage is being inflicted and the relative cytoarchitectural organisation of the tissue is preserved. The subsequently patterned cells will thus, reflect the relative positions of cells of the original slice. By means of the present invention it is possible to consistently achieve, e. g., outgrowth of neurons, neurites and filopodia from brain stem slices cultured on ECM protein structures of, e. g. grid- and line-shapes. By choosing appropriate patterns of cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules on a surface it is possible to achieve almost any pattern of cells desired.

Furthermore, the present inventors managed to further manipulate the almost perfect patterns of cells in that they could easily transfer these patterns onto any other surface desired. Such a transfer can, for example, be performed by embedding the pattern/artificial tissue in materials, which are compatible with the cells in that they do not interfere with the cells' viability. Such a material can for example be agarose which is poured in liquid form over the pattern of cells and thereafter cured by allowing it to cool. An alternative method would be the embedding of cells in a gel of fibrin and/or collagen. For example, fibrinogen can be induced to form a gel of fibrin by the addition of thrombin. Modifications of this method, wherein prothrombin is added in combination with various factors from the blood-clotting cascade, e.g. factor X, are also within the scope of the present invention. Methods of forming fibrin-gels are, for example, described in Schense et al., 2000, *Nature Biotechnology*, 18, 415-419 and Ye et al., 2000, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 17, 587-591 and are included herein by reference.

Collagen-gels can be formed by self-assembly of collagen molecules upon warming cold neutral solutions of collagen. Such a method is, for example, described in O'Connor et al., 2000, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 871-881, and is explicitly included herein by reference.

According to the present invention all matrices, independent of their nature, are assembled on a pattern of cells/artificial tissue that has already been formed on a surface. This means, that according to the present invention the matrix is formed only after the formation of the pattern of cells/artificial tissue. By means of the gel, the pattern of cells can then be transferred elsewhere.


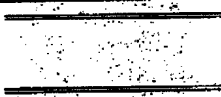


Removal of the matrix can then, for example, be achieved by lowering the temperature below the gel-transition temperature, enzymatic degradation and the like.

This makes the production of bioelectronic devices much more economical and allows for precise control of the characteristics of these devices since only successful patterns of cells will be used and transferred onto the surfaces of these devices. Once a perfect pattern of cells is formed, it can be stabilised using a matrix and removed from the substrate and transferred onto biosensors, such as field effect transistors etc. which in themselves might not be suited as substrates for cell-growth in the first place. With a "pre-cultured-situation" according to the present invention, only useful patterns of cells will be used and transferred onto the devices. Thus the number of devices that are required can be better controlled. This is true for all the other applications mentioned and gives a huge flexibility to possible applications. This "off-the-shelf-approach" is very useful when the device availability is limited, the device itself is not so well suited for cell-growth and culture, or when the further manipulation of cells on these devices causes irreversible damage to the cells. In this case a new pattern of cells (grown on a prepatterned substrate) can be placed onto the same device and the measurements (of whatever kind that is to take place with this particular device) can be resumed. Alternatively, the pattern of cells used in one device can be transferred into sterile conditions (i. e. taken off the device) and then be returned to the incubator for a further period of culture.

The present inventors, using a combination of organotypic whole tissue and carefully designed prepatterned surfaces, managed to produce a huge variety of patterns of cells. According to any requirement (depending on the device) further patterns can be designed. Although the microcontact printing technique is discussed herebelow as a suitable technique for creating a surface which is prepatterned in having cell-growth promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules attached thereon, the present invention is by no means intended to be restricted to this particular technique. Other techniques for creating prepatterned surfaces like photolithography, laser ablation techniques with lithographic masks etc. are envisaged, too.

**Example 1**

Using the present invention a huge variety of patterns of laminin on a surface could be successfully employed in the present invention. These patterns, in which a precise control of the cell-growth could be achieved, are shown in table 1

pattern	structure	dimensions	scheme
1	lines	lines: 2 $\mu\text{m}$ distance: 100 $\mu\text{m}$	
2	lines	lines: 4 $\mu\text{m}$ distance: 100 $\mu\text{m}$	
3	lines	lines: 6 $\mu\text{m}$ distance: 100 $\mu\text{m}$	
7	grid with nodes	lines: 2 $\mu\text{m}$ nodes: 10 $\mu\text{m}$ mesh: 100 x 50 $\mu\text{m}$	



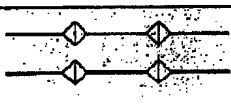


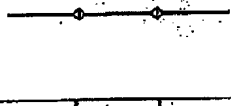



8	grid with nodees	lines: 4 $\mu\text{m}$ nodes: 12 $\mu\text{m}$ mesh: 100 x 50 $\mu\text{m}$	
9	grid with nodes	lines: 6 $\mu\text{m}$ nodes: 14 $\mu\text{m}$ mesh: 100 x 50 $\mu\text{m}$	
10	lines with nodes	lines: 2 $\mu\text{m}$ nodes: 20 $\mu\text{m}$ line distance: 50 $\mu\text{m}$ node distance: 100 $\mu\text{m}$	
11	lines with nodes	lines: 4 $\mu\text{m}$ nodes: 22 $\mu\text{m}$ line distance: 50 $\mu\text{m}$ node distance: 100 $\mu\text{m}$	
12	lines with nodes	lines: 2 $\mu\text{m}$ nodes: 10 $\mu\text{m}$ line distance: 50 $\mu\text{m}$ node distance: 100 $\mu\text{m}$	
13	grid with nodes	lines: 2 $\mu\text{m}$ nodes: 20 $\mu\text{m}$ mesh: 100 x 50 $\mu\text{m}$	
14	grid with nodes	lines: 4 $\mu\text{m}$ nodes: 22 $\mu\text{m}$ mesh: 100 x 50 $\mu\text{m}$	
15	grid with nodes	lines: 6 $\mu\text{m}$ nodes: 24 $\mu\text{m}$ mesh: 100 x 50 $\mu\text{m}$	
24	grid with nodes and gaps	lines: 4 $\mu\text{m}$ nodes: 22 $\mu\text{m}$ gaps: 20 $\mu\text{m}$ mesh: 100 x 50 $\mu\text{m}$	

table 1

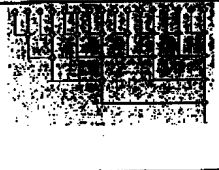

30	cascade (increasing) with dotted lines	lines: 2 $\mu$ m nodes: 20 $\mu$ m dots: 5 $\mu$ m  line distance: 50 $\mu$ m node distance: 100 $\mu$ m	
34	series connection	lines: 2 $\mu$ m nodes: 20 $\mu$ m  line distance: 100 $\mu$ m node distance: 100 $\mu$ m	

table 1 (cont'd)

**Example 2****Organotypic cultures of brain stem slices**

Upon extraction of the whole embryonic 15 – 18 days old Sprague-Dawley rat brains, the medulla and pons were removed by a transverse section through the rostral pons and the cerebellum removed by sectioning the peduncles. Coronal sections of brain stem slices were harvested in sterile conditions in chilled brain slice culture medium (pH 7.4). These slices, which were cut using McIlwain Tissue Chopper, were 250  $\mu$ m thick. The thus prepared slices (usually about 6 to 12 slices per rat brain stem) were placed in an incubator at 37°C and a 5 % CO<sub>2</sub> enriched atmosphere for 4 – 5 hours minimum. This incubation period was provided in order to allow damaged cells (as a result of slicing) to detach from the surfaces of the cut slices. After this incubation period, the slices were then positioned onto controls (laminin-coated) and test substrates (laminin-patterned) using a small surface-polished spatula. Care has to be taken not to further damage the prepared slices. Unlike the method described by Gähwiler (1997, Trends in Neurosci., 20 (10), 471-477) plasma clot or collagen was not used in immobilising the slices as either method would hinder cell migrations, particularly migrations onto ECM patterns. Furthermore, the roller tube technique was deemed unnecessary. Instead, in all culture dishes, a critical amount of medium was added such that the slices did not detach from the surface. After 2 – 3 days in culture, the slices should have undergone significant extent of migration and more medium could be added at that stage. Antimitotic agent, cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (ARA-C, SIGMA C-6645), was added on day 4 or 5 to in-

hibit non-neuronal cells proliferation if and when necessary. If ARA-C was used, the culture medium was reverted back to ARA-C-free after 5 to 7 days.

### **Example 3**

#### **Micro contact printing and solutions**

Microstamps for the experiment were produced by photolithography and moulding. An electron beam writer transposed the different structures designed for the experiment to a chrome mask. Applying UV-photolithography, master moulds were produced out of spin coated 12.5  $\mu\text{m}$  thick photoresist layers (AZ 4562, Clariant GmbH, Germany) on 0.6 mm thick silicon wafers (MEMC Electronic Materials, Germany). Polydimethylsiloxane (PDMS) microstamps were then fabricated curing Sylgard 182 (Dow Corning, Germany) in 10 ml eppendorf tubes for 48 hours at 55 °C upside down on the master moulds. After master mould release final curing was performed for 1 h at 110 °C. In order to increase the stamp hydrophilicity, PDMS stamps were stored in deionized water for a minimum of 24 hours. Prior to patterning, stamps were taken out of the water and sterilised in a 70 % ethanol bath for 1 minute. Inking took place for 30 seconds in 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $\sim 0.25 \mu\text{M}$ ) of laminin solution. The inked stamp was then dried in a soft nitrogen airstream and immediately pressed onto the substrate for 10 seconds. In all experiments, non tissue culture polystyrene petri dishes of 3 cm diameter (Greiner Labortechnik, Germany) were used.

Brain slice medium was made from HAMS F10 (SIGMA; N1387) supplemented with 20-25 % foetal bovine serum (SIGMA, F7524) and 4mM glutamine (SIGMA, G7513). Laminin (1243217, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) was re-constituted in sterile PBS.

### **Example 4**

#### **Patterns of cells achieved**

Figure 1 shows the migration of organotypic brain stem neurons on laminin-coated tissue culture plastic. On day 3 (fig. 1A) in culture, migrated neurons were clearly identifiable and growth of neurites had already begun. On day 5 (fig 1B), these dendritic and axonal proc-



essess had grown to significant length. By 13 (fig. 1C) and 20 days (fig. 1D), the culture became confluent with all the neurons forming a diffused network on top of glial cells and other non-neuronal cells.

Figure 2 shows the effectiveness by which neurite outgrowth and neuronal migration can be guided by using the technique of the present invention. Regardless of the pattern used, brain stem slices on laminin patterned substrates displayed a rapid growth of neurites, and these extended to the edge of the stamped patterns within two weeks. By the end of two weeks, the axons reached maturity and became thickened.

Figure 3 shows the evaluation of a variety of extracellular matrix proteins patterns. (fig. 3AA and 3AB) Pattern 1, node  $10\mu\text{m}$ , track  $2\mu\text{m}$ ; (fig. 3BA and 3BB) Pattern 2, node  $10\mu\text{m}$ , track  $4\mu\text{m}$ ; (fig. 3CA and 3CB) Pattern 3, node  $10\mu\text{m}$ , track  $6\mu\text{m}$ ; (fig. 3DA and 3DB) Pattern 4, node  $10\mu\text{m}$ , track  $2\mu\text{m}$ ; (fig. 3EA and 3EB) Pattern 5, node  $10\mu\text{m}$ , track  $2\mu\text{m}$ ; (fig. 3FA and 3FB) Pattern 6, node  $20\mu\text{m}$ , track  $4\mu\text{m}$ . During early days in culture, the migrated neurons and growing processes were clearly visible with little overlapping on all the patterns. These cultures continued to mature and by 10 days or more, the original shapes of the laminin stamped patterns were identifiable.

Figure 4 shows that nearly perfect patterns could be achieved using a  $2\mu\text{m}$  line width (node diameter =  $10\mu\text{m}$ ) and a perfect grid structure could be formed. The figure shows the growth of neuronal processes on Pattern 1, 14 days old culture at progressively increasing magnification of  $\times 40$  (fig. 4A),  $\times 100$  (fig. 4B),  $\times 200$  (fig. 4C). This perfect network of processes was obtained with pattern of the smallest track ( $2\mu\text{m}$ ). \* indicate the same point of the substrate at their corresponding magnifications. With this particular pattern, however, very few visually identifiable neurons actually migrated to the pattern, which, in turn, is exclusively formed from neurite outgrowth. Patterns with node size of  $10 - 14\mu\text{m}$  and line width of  $2 - 4\mu\text{m}$  were the most appropriate for the confinement of neurons. Experiments using various line widths showed the best neuronal migration occurred with a  $6\mu\text{m}$  line width, where a perfect network of processes had occupied approximately the same area of the original stamp ( $10\text{mm}$  diameter) used for the microcontact printing technique. It is known that cells tend to migrate towards the nodes (Klein et al., 1999, J. of Mat. Sci. Mat. in Med., 10, 721-729; Corey et al.,

1991, J. of Neurosci. Res., 30, 300-307) and the same phenomenon was observed with brain sliced neurons. These neurons became immobilised once migrated onto the nodes. After a number of days in culture, the neuronal processes of the neurons were beginning to grow and were forming a simple linear neuronal network.

The features of the present invention disclosed in the specification, the claims and/or in the accompanying drawings, may, both separately, and in any combination thereof, be material for realizing the invention, in various forms thereof.

#### 4 Brief Description of Drawings

Fig. 1 shows the migration of organotypic brain stem neurons on laminin-coated tissue culture plastic;

Fig. 2 shows the growth of neurites on laminin tracks;

Fig. 3 shows the evaluation of a variety of extracellular matrix protein patterns, and

Fig. 4 shows the growth of neuronal processes.

【図1】

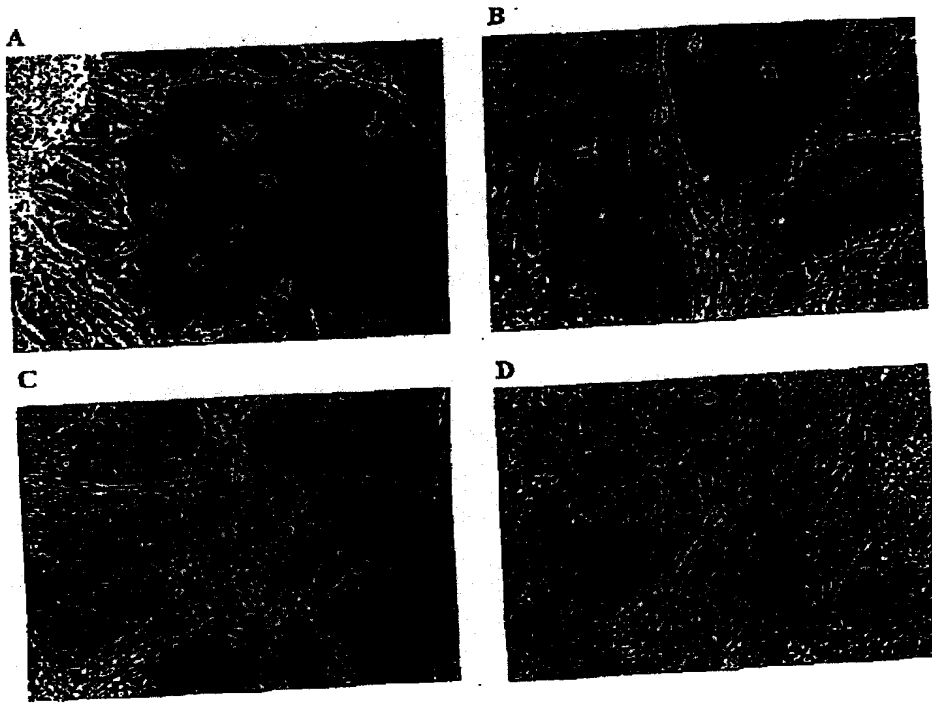


Figure 1

【図2】

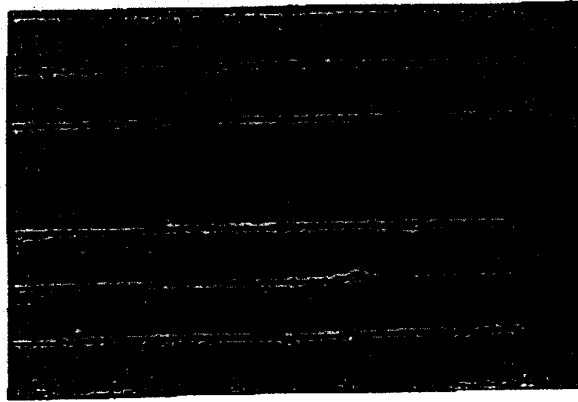


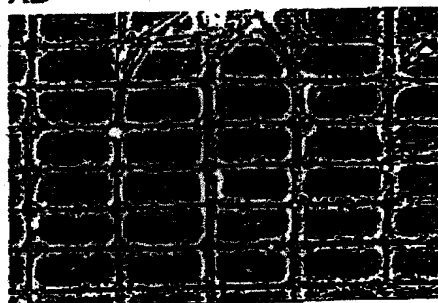
Figure 2

【図3】

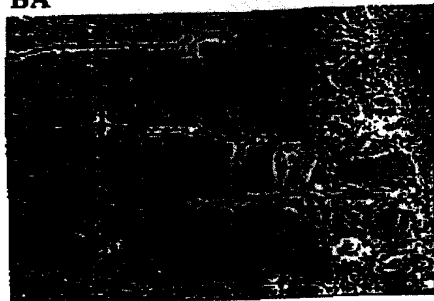
AA



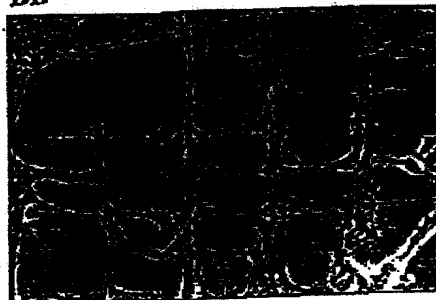
AB



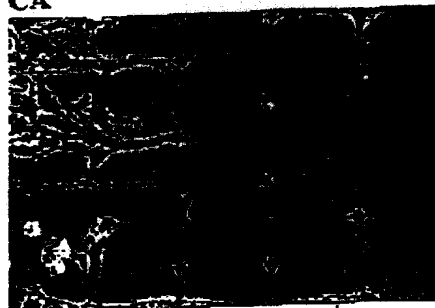
BA



BB



CA



CB



Figure 3

【図4】

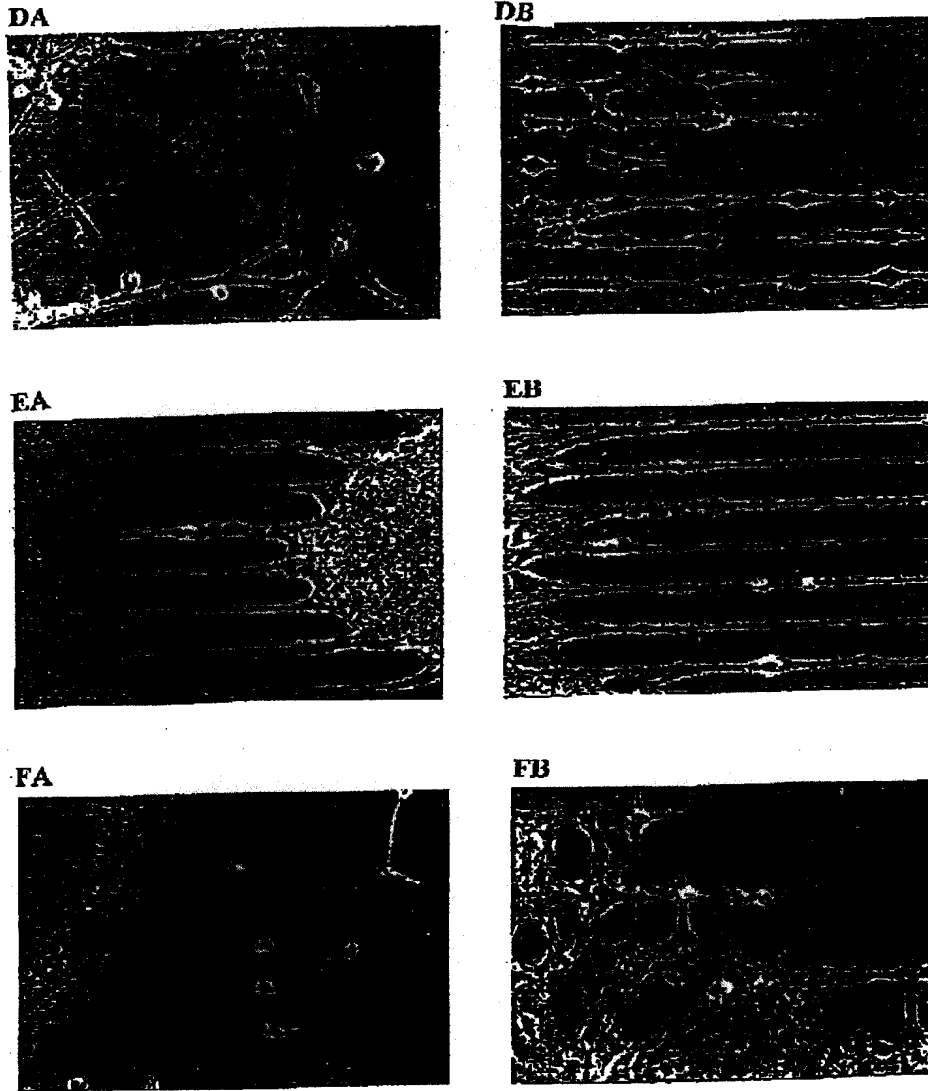


Figure 3 (cont.d)

【図5】

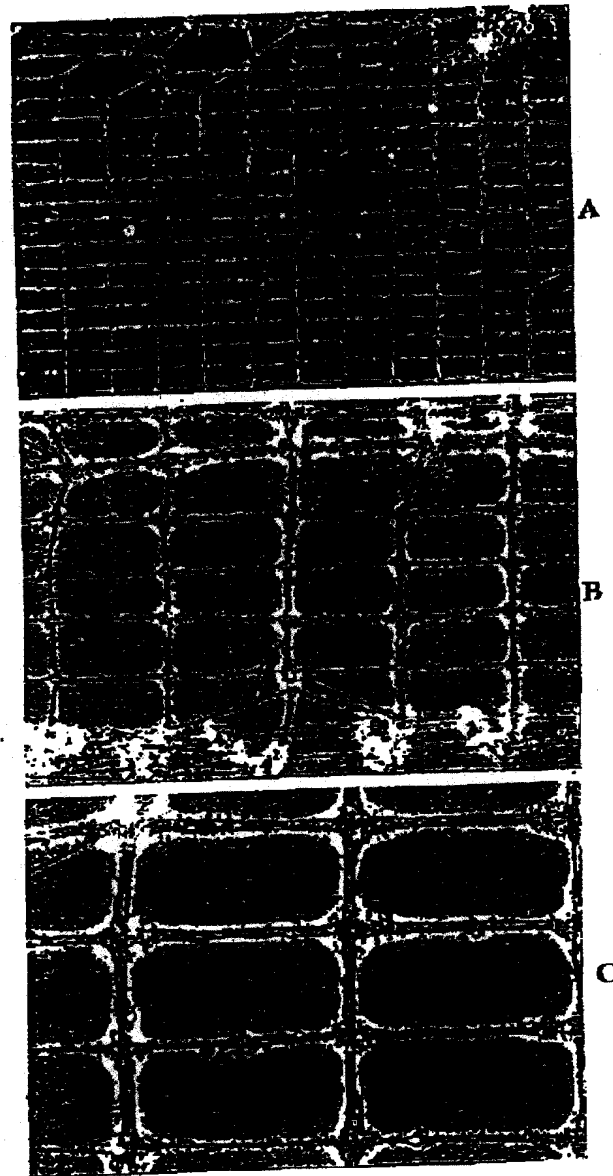


Figure 4

**1 Abstract**

The present invention relates to a method of forming a pattern of cells on a surface, the surface being prepatterned in having a pattern of cell-growth-promoting molecules and/or cell-growth inhibiting molecules attached thereon. The invention also relates to patterns of cells, artificial tissues and to a use thereof.

**2 Representative Drawing**

**Figure 1**